

学 位 論 文 の 要 旨

バイオマイクロデバイスのための微細加工技術とその応用に関する研究
(Study on microfabrication technology for bio micro device and its applications)

氏 名 上野秀貴 印

本論文では、複数の生体組織を単一チップ上に構成する生体外のヒトモデル「Body-on-a-Chip」などへの応用が進められているバイオマイクロデバイスに関して、細胞を培養、操作、評価する立体微細構造の微細加工技術、および、集積化技術の提案と、そのバイオ応用例を示した。

近年、生体機能の解明や生体組織の再現を目的とした、バイオマイクロデバイスの研究が進んでいる。マイクロサイズの細胞からなる生体組織の機能解明やその再現には、対象と同じサイズの微細構造をデバイス内に集積することが不可欠である。そこで、本研究では、光造形に利用される厚膜感光性材料を利用し、細胞サイズの微細な構造の作製と集積法を提案し、これまで作製困難であった微細な構造、あるいはそれを有するバイオマイクロデバイスを実現した。

第一章では、本研究の緒言として、社会的な側面と研究領域の背景について述べた。まず、バイオマイクロデバイスに必要な性能を示し、それぞれについて従来研究における取り組みを説明した。次に、それらバイオマイクロデバイスの作製方法と特徴をまとめ、従来研究についても言及した。さらに、微細構造作製の観点から厚膜感光性材料の特性について示した後、それを用いた本研究の目的と本論文の構成を述べた。

第二章では、傾斜露光法と傾斜酸素アッシング法を組み合わせた加工方法を提案し、マイクロ流路内に複数の垂直多孔メンブレンを集積したバイオマイクロデバイスを作製し、細胞培養評価を行った。まず、提案原理における、垂直多孔メンブレンの最適な加工条件について検討し、従来より高い空隙率の垂直多孔メンブレンと、その垂直多孔メンブレンを集積したマイクロ流路を作製した。さらに、作製したマイクロ流路内に接着性細胞を播種し、垂直多孔メンブレンへの細胞の接着を観察した。垂直多孔メンブレンを集積化したバイオマイクロデバイスの、組織関門構築などへの応用可能性を示した。

第三章では、露光量を調整した裏面露光法と厚膜感光性材料の流動性を利用した集積法を提案し、2次元多孔メンブレンと3次元のポーラス構造を有する細胞培養用構造を作製した。まず、厚膜感光性材料の流動性を局所的に変化させ、構造パターンニングと部分接着

を同時に実現する作製条件を検討した。次に、細胞培養用構造として細胞を透過しない 2 次元のメンブレンと、細胞を含有できる 3 次元の構造を集積した。2 次元のメンブレンを境界として、2 種類の細胞を播種したところ、両構造に細胞が接着し、3 次元の構造の内部で細胞が増殖することを実証した。

第四章では、神経細胞への光刺激とその電位応答取得のための微細要素を集積したデバイスの設計と作製を行った。神経細胞からなる神経細胞ネットワーク内の複数の局所領域に対し異なる波長の光刺激を実現するため、マイクロレンズ、ピンホール、光源固定構造、および電位取得のための電極の 4 つの要素を段階的に集積した。光ファイバを光源として用いることで、デバイス上へ異種光を照射できた。

第五章では、生体の代謝機能の再現を目的とした **Body-on-a-Chip** として、チップとプラットフォームの設計・作製を行った。人体の各臓器の構成細胞数と血管内皮細胞などを考慮した培養チャンバとマイクロ流路を有するチップを、薬物吸収の無いリコン材料を用いて作製した。チップと外部機構をアセンブルしプラットフォームを構築した後、その作製精度と流量を測定した。さらに、プラットフォーム内で細胞培養を行い、複数の環境で同時に細胞を培養できることを示した。

第六章では、本研究の総括として、提案した微細構造作製、集積法についてまとめた。作製方法および集積法については、その特徴と技術的に適応可能な領域と分野について記載した。また、作製したデバイスとプラットフォームの現状の課題と今後の発展の可能性について述べた。さらに、上記のバイオマイクロデバイスに関する作製と集積法の今後の展開として、表面張力を利用して流体を操作する **Open microfluidics** 分野への応用の可能性についてまとめた。

以上の微細構造に関する作製技術と集積技術に関する研究の結果、マイクロ流路への垂直多孔メンブレンの集積方法、2 次元多孔メンブレンと 3 次元ポーラス構造の集積方法が細胞サイズの構造作製に利用できることを示した。また、その応用として、細胞培養バイオマイクロデバイス、オプトジェネティクス、**Body-on-a-Chip** に利用可能なデバイスを複数構築した。構築したデバイスはいずれも各用途に適した作製形状と寸法を有しており、提案した作製方法により微細構造を集積したバイオマイクロデバイスの作製が可能であることを示した。

学 位 論 文 の 要 旨

バイオマイクロデバイスのための微細加工技術とその応用に関する研究
(Study on microfabrication technology for bio micro device and its applications)

氏 名 上野秀貴 印

In this research, the author proposes fabrication and integration methods of three-dimensional (3D) microstructures for a biomicrodevice such as 'Body-on-a-Chip' to construct multiple living tissues on a device. It is experimentally confirmed that the microstructures fabricated by the proposed methods are used for cell culture, cell manipulating and evaluating cells.

In recent years, researches on biomicrodevices have been actively carried out to understand biological functions of living tissues and reproduce biological tissues. Then, it is necessary to integrate complex 3D microstructures of the same size as the target living cells into the device. So, in this research, the author proposes fabrication and integration methods of the microstructures by utilizing thick photoresist used in the common photolithography. By the proposed method, the complex 3D microstructures are fabricated and integrated into the biomicrodevices.

In the first chapter, as the introduction to this research, the background of the social demands and the research area for the biomicrodevice is described. Firstly, the performance required for biomicrodevices and the related conventional researches are explained. Next, in the conventional studies, the fabrication methods and characteristics of the biomicrodevices are investigated. Furthermore, after listing the characteristics of thick photoresist from the viewpoint of microfabrication, the purpose of this research using the characteristics of the thick photoresist and the composition of the thesis are described.

In the second chapter, the author proposed a fabrication method combining the inclined exposure and the inclined oxygen ashing, and fabricated a biomicrodevice which is integrated with vertical porous membranes in a microchannel for cell culture. First, the optimum conditions for fabricating a vertical porous membrane by the proposed principle was experimentally obtained. The fabricated vertical porous membranes have high porosity and are integrated into the microchannel with designed intervals. Furthermore, it is observed that adherent cells are seeded and adhered on the vertical porous membrane in the prepared microchannel. These results show that the biomicrodevice integrated the vertical porous membranes is applicable to the reconstruction of barrier tissues in vitro.

In the third chapter, the author proposed an integration method using a backside exposure method and a reflow method of thick photoresist, and fabricated microstructures having a 2D porous

membrane and a 3D porous structure for cell culture. First, the fabrication conditions to locally change the fluidity of the photoresist and realize the structural patterning and the partial adhesion at the same time were investigated. Next, as a microstructure for cell culture, a 2D porous membrane which does not penetrate cells and a 3D structure which contains cells were integrated. Two kinds of cells were seeded on each side of the fabricated structure by using 2D membrane as a boundary, and it is demonstrated that the cells adhered to both structures and the cells proliferated inside the 3D structure.

In Chapter 4, a biomicrodevice integrating microelements for stimulating to neurons and measuring its electrical reactions was designed and fabricated. For optical stimulation to local regions of the neural network by different kinds of visible lights, microlens, pinhole and light source fixing structure were integrated. Microelectrodes was also integrated for measuring the electrical reaction of neurons. By using an optical fiber as a light source, it was observed that two kinds of visible lights are irradiated to the device surface.

In chapter 5, a chip and a platform were designed and fabricated as a Body-on-a-Chip for the purpose of reproducing metabolic functions of living bodies on a microdevice. The proposed chip having a culture chamber and a microchannel considering the number of endothelial cells of each organ of the human body was made of silicon material to prevent drug absorption on the device surface. After assembling the chip into the platform, its fabrication accuracy and flow rate in the microchannels were measured. Furthermore, the result of cell culture using the platform is seen that cell culture can be performed in the platform.

In Chapter 6, as a summary of this research, the proposed fabrication and integration methods are summarized. Applicable fields of the proposed methods are described. In addition, we discussed current problems of the devices and the platforms and future works.

As a result of this research about the fabrication and the integration methods for fabricating the complex microstructures, it is shown that the vertical porous membranes are integrated into microchannels, and 2D porous membranes and 3D porous structures are integrated by the proposed methods. Additionally, as its applications, a cell culture biomicrodevices, optogenetics, and body-on-a-chip were fabricated. All of the prototype devices have the designed shapes and dimensions suitable for each application, and are seen that it is possible to fabricate biomicrodevices having complex microstructures integrated by the proposed fabrication methods.